



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 29 756 A 1**

⑥1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/70
C 07 K 14/00

②1 Aktenzeichen: P 43 29 756.0
②2 Anmeldetag: 3. 9. 93
④3 Offenlegungstag: 9. 3. 95

DE 43 29 756 A 1

⑦1 Anmelder:

Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218
Ingelheim, DE

⑦2 Erfinder:

Hauptmann, Rudolf, Dr., Ebreichsdorf, AT; Falkner,
Edgar, Dr., Wien, AT; Bodo, Gerhard, Prof., Wien,
AT; Voß, Tilman, Dipl.-Chem. Dr., Mödling, AT;
Maurer-Fogy, Ingrid, Dr., Wien, AT

⑤4 Verfahren zur Herstellung und Reinigung von alpha-Interferon

⑤7 Die Erfindung betrifft ein neues Herstellungsverfahren für rekombinantes IFN- α . Die Expression in *E. coli* erfolgt unter Kontrolle eines phoA-Promotors. Durch die Verknüpfung des IFN- α -Gens mit der STII-Signalsequenz wird die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum sowie ein korrekt prozessierter N-Terminus erreicht. Die Reinigung des Proteins erfolgt durch Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- sowie Anionenaustauschchromatographie.

DE 43 29 756 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Herstellungsverfahren für Interferon- α (IFN α) durch bakterielle Expression und anschließende Isolierung, einen Expressionsvektor dafür sowie ein Verfahren zur Reinigung von IFN α .

Verfahren zur Herstellung von IFN α durch bakterielle Expression sind bekannt. Das übliche Verfahren beruht auf der cytoplasmatischen Expression des Proteins in *Escherichia coli*, bei dem das exprimierte IFN α entweder in unlöslicher Form in sogenannten Einschlusskörpern in der Zelle vorliegt oder in der löslichen Fraktion nach dem Aufschließen der Zellwand gefunden wird (Thatcher et Panayotatos, 1986; Goeddel et al., 1980; Dworkin-Rastl et al., 1983). Die cytoplasmatische Expression weist allerdings Nachteile auf. Das synthetisierte Protein ist nicht korrekt gefaltet, und weil im Zytoplasma reduzierende Bedingungen herrschen, enthält es nicht die erforderlichen Disulfidbrücken. Das gebildete IFN α muß daher bei der Präparation oxidiert und umgefaltet werden. Dieser Prozeß ist ineffizient und führt zu unerwünschten Nebenprodukten (ganz- oder teilreduzierte Formen, Oligomere durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung, fehlgefaltete Formen durch Ausbildung falscher Disulfidbrücken), die schwierig abzutrennen sind. Ein weiteres Problem ist, daß das N-terminale Methionin, mit dem die Translation beginnt, vom intrazellulär synthetisierten IFN α nur unvollständig abgespalten wird. Das daraus resultierende N-Met-IFN α kann vom nativen IFN α praktisch nicht abgetrennt werden.

Ein weiterer Nachteil gegenwärtig benutzter Verfahren ist die Verwendung von Promotoren, die in nicht-induziertem Zustand nicht vollständig abgeschaltet sind, die durch Zugabe von Chemikalien induziert werden müssen, und deren Expressionsrate im induzierten Zustand nicht befriedigend ist, wie z. B. der *trp*-Promotor aus *Serratia marcescens*.

Um einige der genannten Nachteile zu überwinden und trotzdem das ökonomische *E. coli*-System zu nutzen, versuchten Breitling et al. (Breitling et al., 1989) IFN α 1 und ein IFN α 1/2-Hybrid mit einem Vektor zu exprimieren, der die Sekretion des Interferons durch die Zellmembran in den periplasmatischen Raum ermöglichte. Sie verwendeten dabei Promotor, Ribosomenbindungsstelle (RBS) und Signalsequenz eines bakteriellen Staphylokinasegens (sak42D). 60–80% des so hergestellten IFN α wurden in den periplasmatischen Raum sezerniert. Das Protein enthielt allerdings, bedingt durch das Vektorkonstrukt, zusätzliche N-terminale Aminosäuren, die im entsprechenden nativen IFN α nicht vorkommen. Als gravierender Nachteil dieses Expressionssystems erwies sich indes die Tatsache, daß die mit diesem Konstrukt transformierten Stämme genetisch nicht stabil blieben; die Expressionskassette wurde durch die spontane Insertion eines IS1-Elements deaktiviert. Die Aufgabe, ein Expressions/Sekretionssystem in *E. coli* für die Herstellung von humanem IFN α bereitzustellen, war im Stand der Technik also ungelöst.

Als eine Expressions/Sekretions-Kassette, die im Falle der Expression des menschlichen Wachstumsfaktors-Rezeptors in *E. coli* zum Erfolg geführt hatte, war ein Konstrukt aus dem Promotor der alkalischen Phosphatase (*phoA*) und der Signalsequenz des hitzestabilen Enterotoxins II (STII) bekannt (Fuh et al., 1990).

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von rekombinantem IFN α in *E. coli* ist die Reinigung des Proteins aus dem Bakterienlysat. Hier sind eine Reihe von Verfahren bekannt (Thatcher et Panayotatos, 1986; EP-A 203 382). Um die native Faltung des Proteins zu erhalten, sind dabei Verfahren vorzuziehen, die ohne Denaturierungs- und Fällungsschritte auskommen. Ein solches Verfahren wird in der EP-S 396 555 beschrieben. Es besteht aus den Schritten Immunoaffinitätschromatographie, Reversed-Phase-Chromatographie (RPC), Kationenaustauschchromatographie, Konzentrierung durch Ultrafiltration und Gelfiltrationschromatographie. Dieses Verfahren beruht wie andere bekannte Verfahren auf der hohen Selektivität der Immunoaffinitätschromatographie im ersten Schritt. Es ist kein Verfahren zur Herstellung von hochgereinigtem IFN α insbesondere IFN α 2, bekannt, das ohne Denaturierungs-/Fällungsschritte und ohne Immunoaffinitätschromatographie auskommt. Gleichzeitig ist ein solches Verfahren aus ökonomischen und technischen Gründen wünschenswert. Wegen der für die Immunoaffinitätschromatographie notwendigen monoklonalen Antikörper sind ihre Kosten hoch, gleichzeitig ist, da die Lebensdauer der antikörpergekoppelten Matrices endlich ist, eine kontinuierliche Versorgung mit diesen Antikörpern notwendig.

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines wirtschaftlicheren und leistungsfähigeren Verfahrens zur Herstellung von Interferon- α , insbesondere Interferon- α 2, durch rekombinante Expression in *E. coli*. Dabei mußte das Problem gelöst werden, ein effizientes und stabiles System zur Expression/Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum oder das Kulturmedium zu etablieren. Ferner war ein Verfahren zu entwickeln, das exprimierte Protein schonend ohne Denaturierungs-/Fällungsschritte und ohne die Notwendigkeit der Immunoaffinitätschromatographie hochreinigen kann.

Diese Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung gelöst werden. Die Etablierung eines stabilen Expressions/Sekretionssystems für IFN α in *E. coli* gelang durch die Konstruktion eines Vektors, der die Signalsequenz (Leadersequenz) des hitzestabilen Enterotoxins II (STII) aus *E. coli* verknüpft mit der kodierenden Sequenz für ein reifes menschliches Interferon- α , vorzugsweise Interferon- α 2, enthält. Bevorzugt erfolgt die Expressionskontrolle mittels des Promotors der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*). Als vorteilhaft erwies sich ferner die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII Gens. Ein weiterer überraschender Fortschritt konnte durch die Bereitstellung eines Reinigungsverfahrens für Interferon- α , das aus den Schritten Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Kationenaustauschchromatographie und Anionenaustauschchromatographie besteht, erreicht werden.

Ein Aspekt der Erfindung betrifft somit ein Verfahren der Herstellung von IFN α durch bakterielle Expression, bei dem transformierte Bakterienzellen verwendet werden, die einen Expressionsvektor enthalten, in dem die STII-Signalsequenz mit einem IFN α -Gen verknüpft ist, und durch Isolierung des exprimierten IFN α . Ein weiterer Aspekt betrifft einen bakteriellen Expressionsvektor für die Herstellung von IFN α , der ein Konstrukt aus der Signalsequenz des STII-Gens und einem IFN α -Gen enthält, sowie die Verwendung eines solchen Vektors zur Herstellung von IFN α . Ein dritter Aspekt betrifft ein Verfahren zur Reinigung von IFN α durch die

chromatographischen Schritte Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- sowie Anionenaustauschchromatographie.

Als Ausgangspunkt für die Konstruktion des Vektors kann ein in *E. coli* replikationsfähiges Plasmid dienen, beispielsweise eignet sich das Plasmid pAT153 (Twigg et al, 1980) sehr gut für diesen Zweck. Eine Nukleotidsequenz, die für das Signalpeptid des STII-Gens kodiert, ist Stand der Technik (Picken et al, 1983; Lee et al, 1983). Der Fachmann ist in der Lage, durch Mutationen (Substitution, Deletion, Insertion, Addition) Varianten dieser Sequenz herzustellen, ohne ihre Grundeigenschaften zu verändern, und insbesondere solche Nukleotidsequenzen herzustellen, die wegen der Degeneration des genetischen Codes für die gleiche Aminosäuresequenz des Signalpeptids kodieren (Sambrook et al, 1989, bes. Kapitel 15). Eine ganze Reihe von Sequenzen, die für Mitglieder der IFN α -Familie kodieren, ist bekannt (Mantei et al, 1980; Streuli et al, 1980; Goeddel et al, 1981); die Homologie der sie kodierenden Gene beträgt mehr als 70%. Weitere Varianten dieser Sequenzen können in der Natur gefunden werden oder mit Methoden aus dem Stand der Technik, z. B. durch Mutagenese, aus den bekannten Sequenzen hergestellt werden (Sambrook et al, 1989, bes. Kapitel 15). Der Begriff "IFN α " im Sinne der Erfindung schließt demzufolge neben den bekannten Sequenzen auch solche Varianten ein, deren Gene durch hohe Homologie zu den bekannten Sequenzen gekennzeichnet sind und die für biologisch aktives IFN α kodieren. Besonders bevorzugt ist dabei die Sequenz, die für IFN α 2c kodiert (Dworkin-Rastl et al, 1983; Bodo et Fogy, 1985). Besonders bevorzugt ist ferner die Verwendung des *phoA*-Promotors zur Kontrolle der Expression und darüber hinaus vorteilhaft die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens. Die Sequenz des *phoA*-Promotors (Chang et al, 1986; Shuttleworth et al, 1981) sowie der STII-Ribosomenbindungsstelle (Picken et al, 1983; Lee et al, 1983) sind bekannt; auch aus diesen Sequenzen kann der Fachmann ohne weiteres äquivalente Varianten herstellen. Konstruktion des Vektors, Transformation geeigneter *E. coli*-Stämme, Fermentation sowie Extraktion können nach an sich bekannten Methoden erfolgen (Sambrook et al, 1989). Für die Expression ist beispielsweise der *E. coli*-Stamm W3110 (*E. coli* K12 Wildtyp f^- , λ^- , IN (*rrnD*-*rrnE*)) gut geeignet. Die Vorkultur kann gut in LB-Medium, die Hauptkultur unter Kontrolle von Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr bis zu einer OD₅₄₆ von 250 bis 280 erfolgen. Als gut geeignet erwies sich ein Extraktionsverfahren, bei dem säureinaktivierte Biomasse in verdünnter Essigsäure mit Hilfe eines Homogenisators suspendiert, mit Polyethylenimin, bevorzugt in einer Konzentration von 0,25% (w/v) versetzt, auf alkalischen pH, vorzugsweise pH 10, eingestellt, gerührt und anschließend durch Zentrifugation die Bakterien abgetrennt wurden. Die Reinigung kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen (Thatcher et Panayotatos, 1986; EP-A 203 382). Besonders vorteilhaft ist jedoch ein Reinigungsverfahren mit vier chromatographischen Schritten, und zwar Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- und Anionenaustauschchromatographie. Als Gelbett der Silicachromatographie erwies sich das vom Typ 953W der Firma Grace gut geeignet, als Elutionsmittel war ein Puffer, der 500–1500 mM Tetramethylammoniumchlorid (TMAC), bevorzugt 800 mM TMAC, vorteilhaft verwendbar. Für die hydrophobe Interaktionschromatographie erwies sich eine Phenylsepharose als gut zu verwendendes Gelbett. Der Probenauftrag erfolgte vorzugsweise in Anwesenheit von 20% Ammoniumsulfat, die Säule war mit einem Puffer, der 30% Ammoniumsulfat enthielt, equilibriert worden. Das IFN α wurde mit einem linearen Gradienten mit einer Endkonzentration von 30% Ethylenglykol eluiert. Die Kationenaustauschchromatographie konnte sehr gut mit einem Sulfopropyl-Ionenaustauscherharz ausgeführt werden. Der Probenauftrag erfolgte bei einem pH-Wert von 3–5, vorzugsweise pH 3, die Säule war auf pH 5 equilibriert. IFN α konnte erfolgreich mit einem linearen Kochsalzgradienten mit einem Zusatz von 10% Ethylenglykol eluiert werden. Als Gelbett für die Anionenaustauschchromatographie war DEAE-Sepharose sehr vorteilhaft zu verwenden, Auftrag und Elution erfolgten bei pH 5,5–6,0, vorzugsweise bei pH 5,8. Zur Elution war ein linearer Kochsalzgradient mit einem Zusatz von 0,1% Tween 20 gut geeignet. Es gehört zu den technischen Möglichkeiten des Fachmanns, ohne erfinderische Tätigkeit jeweils eines oder mehrere Gelmaterialien durch gleichwertige zu ersetzen, die auf den gleichen Trennprinzipien basieren, und auf diese Weise das erfindungsgemäße Verfahren äquivalent auszuführen.

Überraschenderweise konnte mit der Verknüpfung der STII-Signalsequenz mit dem IFN α -Gen ein stabiles Expressions/Sekretionssystem etabliert werden, was mit der vorbeschriebenen sak42D-Leader/IFN α -Kombination nicht gelungen war. Als besonders erfolgreich erwies sich die Expression dieser Sequenz unter der Kontrolle des *phoA*-Promotors. Die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens erwies sich in diesem Zusammenhang als zusätzlich vorteilhaft. Die Expression kann über die Kontrolle der Phosphatkonzentration im Medium (Phosphatmangel aktiviert den *phoA*-Promotor) zuverlässig gesteuert werden; im inaktivierten Zustand gibt es keine nachweisbare Basalexpression. Zusätzliche Chemikalien brauchen zur Aktivierung nicht zugegeben zu werden, die Expressionsrate im aktivierten Zustand ist hoch. Das synthetisierte Protein wird in hohen Anteilen in den periplasmatischen Raum sezerniert. Das sezernierte Protein ist korrekt gefaltet, enthält den authentischen N-Terminus und die richtigen Disulfidbrücken. Die SDS-Gelanalyse der Expression in *E. coli* W3110 zeigte, daß 30–50% des synthetisierten IFN α korrekt prozessiert waren, dies entspricht praktisch dem kompletten Anteil des sezernierten Proteins.

Mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Extraktionsverfahren konnten $29,3 \pm 5,9\%$ des insgesamt in der Biomasse nachweisbaren IFN α 2c extrahiert werden. Dies entsprach dem beobachteten Prozessierungsgrad von 30–50%. Der Extrakt aus der Biomasse enthielt $4,5 \pm 1,8\%$ IFN α 2c, bezogen auf Gesamtprotein. Die Silica-Adsorptionschromatographie führte zu einem IFN α 2c-Pool mit einer durchschnittlichen Reinheit von $16,7 \pm 4,4\%$. Die Phenyl-Sepharose-Chromatographie mit einer Ausbeute von $93,2 \pm 7,3\%$ ergab ein IFN α 2c mit einer Reinheit von $71,2 \pm 15,5\%$. Die Sulfopropyl-Ionenaustauschchromatographie erbrachte eine Ausbeute von $70,9 \pm 14,8\%$ und eine Reinheit von $97,6 \pm 4,6\%$. Der letzte Schritt, die DEAE-Ionenaustauschchromatographie, führte bei einer Ausbeute von $86,9 \pm 9,2\%$ zu 100% reinem IFN α 2c, wie unten charakterisiert. Die Daten aus 6 verschiedenen Reinigungen sind in den Tabellen 1 (Ausbeuten) und 2 (IFN α 2c-Gehalt) zusammengefaßt. Fig. 3 zeigt charakteristische Chromatogramme von jedem Reinigungsschritt.

Aus 1 kg Biomasse wurden 340 ± 100 mg gereinigtes IFN α 1c erhalten. Die Ausbeute des Reinigungsprozesses ist $56.1 \pm 22.2\%$. Die Gesamtausbeute, bezogen auf den IFN α 2c-Gehalt der Biomasse ist 14.4%. Diese Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Fig. 4 zeigt eine typische SDS-PAGE von gereinigtem IFN α 2c, eluiert beim letzten chromatographischen Schritt. Die 18-kDa-Bande von IFN α 2c ist die einzige sichtbare Bande. Kontaminierende Banden werden nicht beobachtet. Fig. 5A zeigt ein typisches Reversed-Phase-HPLC-Chromatogramm. Das gereinigte IFN α 2c eluiert als homogener Peak bei 24.8 Minuten. Wurde dieses Material mit einem flachen Acetonitrilgradienten eluiert (Fig. 5B), wurden 2 Kontaminationspeaks an beiden Seiten des Hauptpeaks beobachtet. Diese Schultern, die etwa 1.8% des Gesamt-IFN α 2c-Gehaltes enthalten, repräsentieren Formen, die am Methionin 111 oxidiert (erste Schulter) oder am N-Terminus acetyliert (zweite Schulter) sind.

Tabelle 1

Ausbeuten verschiedener Reinigungsschritte in Prozent IFN α 2, die nach dem jeweiligen Reinigungsschritt erhalten wurden, dargestellt für 6 verschiedene Reinigungsprozeduren (p1—p6) aus 6 verschiedenen Biomassen. Die letzten beiden Spalten enthalten den Mittelwert (M) und die Standardabweichung (sd)

| | p1 | p2 | p3 | p4 | p5 | p6 | M | sd |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|------|
| Extrakt | 37.9 | 24.0 | 34.3 | 30.7 | 29.1 | 20.0 | 29.3 | 5.9 |
| Silica | 62.0 | 95.8 | 88.2 | 99.5 | 74.1 | 81.0 | 83.4 | 12.8 |
| Phenyl | 100.0 | 82.2 | 85.9 | 100.0 | 100.0 | 91.0 | 93.2 | 7.3 |
| Sulfopro | 64.0 | 54.3 | 76.5 | 100.0 | 60.0 | 71.0 | 70.9 | 14.8 |
| DEAE | 95.0 | 100.0 | 83.5 | 88.2 | 84.0 | 71.0 | 86.9 | 9.2 |

Tabelle 2

IFN α 2-Gehalt verschiedener Reinigungsschritte. Die Daten sind als Prozentsatz des IFN α 2-Gehalts, bezogen auf den Gesamtproteingehalt; der bei diesem Reinigungsschritt erhalten wurde, so dargestellt wie in Tabelle 1

| | p1 | p2 | p3 | p4 | p5 | p6 | M | sd |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Extrakt | 8.0 | 2.1 | 4.1 | 4.7 | 3.6 | 4.4 | 4.5 | 1.8 |
| Silica | 12.9 | 11.6 | 15.7 | 15.7 | 19.4 | 15.6 | 16.7 | 4.4 |
| Phenyl | 76.6 | 43.3 | 62.9 | 62.9 | 80.0 | 93.5 | 71.2 | 15.5 |
| Sulfopro | 98.5 | 87.3 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 97.6 | 4.6 |
| DEAE | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 0.0 |

Tabelle 3

Gesamtausbeuten des Reinigungsverfahrens. Der IFN α 2c-Gehalt der Biomasse ist als g IFN α 2/kg Biomasse dargestellt. Prozessierung und Extraktion sind als Prozentsatz des Gesamtgehalts an IFN α 2 ausgedrückt. Die Ausbeute der Reinigung ist dargestellt als Prozentsatz von IFN α 2c relativ zum IFN α 2-Gehalt des Extrakts. Die Gesamtausbeute ist in mg IFN α 2, erhalten pro kg Biomasse, und als Prozentsatz von gereinigtem IFN α 2c, bezogen auf den IFN α 2c-Gehalt des Extrakts, ausgedrückt

| | p1 | p2 | p3 | p4 | p5 | p6 | M | sd |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Biomasse [g/kg] | 1.4 | 1.0 | 1.1 | 1.5 | 1.1 | 1.8 | 1.3 | 0.2 |
| Prozessierung [%] | 50 | 40 | 40 | 40 | 20 | 40 | 38.3 | 8.9 |
| Extraktion [%] | 37.9 | 24.0 | 34.3 | 30.7 | 29.1 | 20.0 | 29.3 | 4.7 |
| Reinigung [%] | 39.7 | 42.7 | 57.9 | 90 | 44.5 | 52.3 | 56.1 | 22.2 |
| Gesamtausbeute [mg] | 538 | 206 | 366 | 480 | 280 | 258 | 340 | 120 |
| Gesamtausbeute [%] | 14.3 | 20.3 | 16.6 | 23.9 | 10.9 | 7.4 | 14.4 | 6.9 |

Abbildungen

Fig. 1A) Genkarte von pCF2. Das EcoRI-BamHI-Fragment von pAT153 wurde durch die Expressionskassette für IFN- ω 1 ersetzt.

B) Sequenz des EcoRI(zerstört)-BamHI-Teils, der den phoA-Promotor, STII-Leader + IFN ω 1-Gen enthält.

Fig. 2A) Genkarte des Plasmids pDH13. Das SspI-PstI-Fragment von pAT153 wurde durch die IFN α 2c-Expressionskassette (EcoRI-PstI-Fragment von 2B)) ersetzt. Das β -Lactamase-Gen ist zerstört.

B) Nukleotidsequenz des EcoRI-HindIII-Inserts von pDH13.

Fig. 3 Chromatographische Reinigung von IFN- α 2c, extrahiert aus Biomasse.

A) Adsorptionschromatographie auf Silicagel. Der Pfeil zeigt die Elution mit 800 mM Tetramethylammoniumchlorid an.

B) Hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose. Die Elution wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) durchgeführt.

C) Sulfopropyl-Kationenaustauschchromatographie. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) ausgeführt.

D) Anionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) durchgeführt.

Die Balken unter den Hauptpeaks in jedem Chromatogramm zeigen die IFN α 2c-haltigen Pools an, die gesammelt und für die folgenden Schritte verwendet wurden.

Fig. 4 SDS-PAGE von gereinigtem IFN α 2c, gefärbt mit Coomassie Blue. Die Zahlen am linken Rand zeigen die Molekulargewichte der Standardproteine an.

Spur 1: IFN α 2c-Standard

Spur 2 : 3 μ g IFN α 2c

Spur 3 : 6 μ g IFN α 2c

Spur M: Molekulargewichtsstandard.

Fig. 5 Charakterisierung von gereinigtem IFN α 2c durch Reversed Phase HPLC.

A) Elution von IFN α 2c mit einem linearen Gradienten von 20—68% Lösungsmittel B in 24 Minuten.

B) Elution von IFN α 2c mit einem linearen Gradienten von 45—53% Lösungsmittel B in 30 Minuten.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung des Expressionsvektors pDH13 sowie damit transformierter Zellen

Allgemeine Methoden

Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Auffüllreaktionen, Phenolextraktion und Fällung von DNA, Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen, Ligation von DNA-Molekülen, Transformation von Bakterien und Plasmidisolierung aus Bakterien sind Standardverfahren und wurden durchgeführt wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben.

Plasmide

pCF2 pCF2 wurde aus dem Plasmid pAT153 (Twigg et al, 1980) hergestellt. Es enthält den Promotor der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (phoA, Chang et al., 1986; Schuttleworth et al., 1986), die kodierende Region des STII-Leaderpeptids (Picken et al., 1983; Lee et al., 1983) sowie das Gen für menschliches IFN α 1 (Hauptmann et al., 1985). Fig. 1 zeigt die Genkarte von pCF2 sowie die Sequenz des relevanten Abschnitts.

pER21/1 pER 21/1 ist ein bakterieller Expressionsvektor für IFN α 2c (Dworkin-Rastl et al., 1983)
Oligonukleotide (5' \rightarrow 3'):

10 EBI-2787: CGTCTTCAAGAATTTCGAGATTATCG
EBI-2799: GGCAGATCACATGCATAGGCATTTGTAGCAATAG
15 EBI-2798: ATGCCTATGCATGTGATCTGCCTCAAACCCACAGC
EBI-2797: GACTTCAGAAGCTTCTGCAGTTACGATCGTTATCATTCCCTTAC
20 TTCTTAAACTTTC

Herstellung der Expressionskassette aus phoA-Promotor, IFN α 2c-Sequenz und STII-Leadersequenz in einer Zweischritt-PCR

25 pER21/1-DNA wurde mit HindIII linearisiert, pCF2-DNA mit PvuI. Die im folgenden verwendete Methode ist als SOE-PCR beschrieben ("splicing by overlap extension", Ho et al., 1989).

PCR 1a (Amplifikation des IFN- α 2c-Gens): 100 ng linearisierter pER21/1-DNA, 25 pmol EBI-2797 und 25 pmol EBI-2798 wurden in 50 μ l Puffer, der 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Gelatine, 0.2 mM ATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP und 1.25 Einheiten Taq-Polymerase enthielt, in einem Perkin Elmer Cetus Thermocycler TC-1 Thermozyklen unterworfen. Nach 3 min Inkubation bei 94°C wurden 10 Stufenzyklen (Stufe 1 : 40 sec bei 94°C, Stufe 2 : 30 sec bei 55°C, Stufe 3 : 90 sec bei 72°C) ausgerührt.

PCR 1b (Amplifikation von phoA-Promotor plus STII-Leadersequenz): 100 ng linearisierter pCF2-DNA, 25 pmol EBI-2787 und 25 pmol EBI 2799 wurden im gleichen Puffer und unter gleichen Bedingungen wie unter PCR 1a beschrieben Thermozyklen unterworfen.

Die resultierenden DNA-Fragmente von PCR 1a (540bp) und PCR 1b (374 bp) wurden gelgereinigt (1.2% low gelling type Agarose in TBE-Puffer, 1 \times TBE: 10.8 g Tris/l, 5.5 g Borsäure/l, 0.93 g EDTA/l). Das Agarosestückchen, das das jeweilige DNA-Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten und die Agarose geschmolzen, indem 100 μ l H₂O zugegeben und auf 70°C erhitzt wurde.

40 PCR 2: 5 μ l von jeder Agarose/DNA-Lösung wurden vereinigt und in 100 μ l Lösung, die jeweils 50 pmol von EBI-2787 und EBI-2797 enthielt, Thermozyklen unterworfen. Der Puffer war der gleiche wie unter PCR 1a beschrieben. Das Thermozyklusgerät wurde so programmiert, daß an eine Verzögerungszeit von 5 min bei 94°C 20 Stufenzyklen (Stufe 1: 40 sec bei 94°C, Stufe 2 : 30 sec bei 55°C, Stufe 3: 5 min bei 72°C; Stufe 3 wurde bei jedem neuen Zyklus um 5 Sekunden verlängert) angeschlossen wurden. Nach der Amplifikation wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt. Das PCR-Produkt wurde aufgelöst und mit HindIII und EcoRI in den entsprechenden Puffern geschnitten.

Klonierung des PCR-Produktes (pDH9)

50 Bluescribe M13⁺ (Stratagene, San Diego, CA, USA) wurde mit HindIII und EcoRI doppelt geschnitten und das große Fragment wurde mit einem 1.2%igen Agarosegel gelgereinigt. 10 ng Bluescribe M13⁺ DNA und 50 ng mit EcoRI/HindIII geschnittenes PCR-Produkt wurden in 10 μ l Lösung, die 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 20 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 50 μ g/ml Rinderserumalbumin (BSA) und 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (NEN) enthielt, 1 Stunde bei 0°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur ligiert. 8 μ l dieser Lösung wurden für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen vom Stamm JM 101 (*E. coli* K12, SupE, thi, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI Δ M15]) verwendet.

Ein Klon wurde ausgewählt, die DNA isoliert und die Expressionskassette sequenziert. Die Sequenz entsprach genau der theoretisch erwarteten Sequenz (Fig. 2). Das Plasmid wurde als pDH9 bezeichnet.

60 Konstruktion des Expressionsplasmids pDH13

pAT153 wurde mit SspI und PstI doppelt geschnitten und das große Fragment wurde isoliert. pDH9 wurde mit Eco RI geschnitten und die Enden aufgefüllt unter Verwendung des Klenowfragments der DNA-Polymerase I und der 4 dNTPs. Nach Phenolextraktion und Fällung der linearen pDH9-DNA wurde diese DNA mit Pst I geschnitten und das Fragment, das den phoA-Promotor, die STII-Leadersequenz und das IFN α 2c-Gen enthielt, aus einem 1%igen Agarosegel isoliert.

10 ng pAT153 \times SsoI \times PstI und 30 ng des Fragments, das die Expressionskassette enthielt, wurden in 10 μ l Lösung für 5 Stunden bei Raumtemperatur ligiert. 5 μ l von diesem Ansatz wurden verwendet, um kompetente *E.*

coli-Bakterien des Stammes HB101 zu transformieren. Die Selektion der transformierten Bakterien wurde auf LB-Agarplatten (10 g Trypton/l, 5 g Hefeextrakt/l, 5 g NaCl/l, 15 g Bacto-Agar/l) durchgeführt; die 10 µg/ml Tetracyclin enthielten. Eine Genkarte von pDH13 und die Sequenz der relevanten Region ist in Fig. 2 dargestellt.

Plasmid-DNA verschiedener so erhaltener Kolonien wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse auf korrekte Zusammensetzung überprüft. Ein Plasmid wurde ausgewählt und als pDH13 bezeichnet. Das Plasmid pDH13 wurde zur Transformation von E. coli W3110 (E. coli K12 Wildtyp, f⁻, λ⁻, IN (rrnD-rnnE)1) verwendet.

Beispiel 2: Fermentation

Vorkultur

700 ml autoklaviertes LB-Medium (10 g Bacto-Trypton/l, 5 g Bacto-Hefeextrakt/l, 10 g NaCl/l, pH 7.0), das 5 mg/l Tetracyclin enthielt, wurden in einem 2l-Glasgefäß aus einer Stockkultur so beimpft, daß eine OD₅₄₆ von 0.01 erhalten wurde. Die Kultur wurde 10 Stunden bei 37°C unter starkem Rühren (800 U/min) und Belüftung (5 Fermentervolumina pro Minute [vvm]) inkubiert.

Hauptkultur

Mediumzusammensetzung

im Fermenter:

1.21 g/l (NH₄)₂HPO₄
 3.96 g/l (NH₄)₂SO₄
 6.53 g/l K₂HPO₄
 1.23 g/l MgSO₄ × 7H₂O
 0.32 g/l NaCl
 0.25 g/l NH₄Cl
 1.0 g/l Na₃-Citrat × 2H₂O
 1.0 ml/l Spurenelementekonzentrat
 12.5 g/l Glucose
 20 mg/l Thiamin-HCl
 50 mg/l L-Tryptophan
 100 mg/l L-Leucin
 50 mg/l L-Methionin
 5 mg/l Tetracyclin

Spurenelementekonzentrat:
 (Mengenangaben pro 100 ml)

3.35 g FeCl₃ × 6H₂O
 1.09 g ZnSO₄ × 7H₂O
 0.267 g CoCl₂ × 6H₂O
 0.267 g Na₂MoO₄ × 2H₂O
 0.221 g CuSO₄ × 5H₂O
 0.333 g H₃BO₃
 1.37 g MnSO₄ × H₂O
 10 ml HCl conc.
 H₂O ad 100 ml

Fütterung während der Fermentation:
 (Mengen bezogen auf Fermentervolumen)

350 g/l Glucose
 3.70 g/l MgSO₄ × 7H₂O
 175 mg/l Thiamin-HCl
 0.50 g/l L-Tryptophan
 4.0 g/l L-Leucin
 2.0 g/l L-Methionin

Zudosierung von Antischaummittel während der Fermentation:
 (bezogen auf Fermentervolumen)

1.0 ml/l UCON LB625

Salze ((NH₄)₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, NaCl, NH₄Cl und Na-Citrat) wurden in einem Fermenter sterilisiert. Spurenelemente, MgSO₄, Glucose, Thiamin, L-Tryptophan, L-Leucin, L-Methionin und Tetracyclin wurden nach Abkühlung aseptisch so zugegeben, daß ein Startvolumen von 7 Litern erhalten wurde. 600 ml der Vorkultur

wurden automatisch in den Fermenter überimpft. Die Fermentationsbedingungen waren: Rühren bei 1000 U/min, Belüftung von 1 vvm, 0,3 bar Überdruck, eine Temperatur von $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, der pH wurde auf 6.7 ± 0.1 mit NH_3 und H_2SO_4 gehalten. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde durch Belüftung mit sauerstoffangereicherter Luft nach Bedarf oberhalb von 15% Luftsättigung (bei 0,3 bar Gegendruck Überdruck gehalten).

5 Nach Verbrauch der anfänglich vorhandenen Glucose wurde eine Fütterungsprozedur gestartet, die durch die Sauerstoffkonzentration automatisch ausgelöst wurde und Glucose, Thiamin, MgSO_4 , L-Tryptophan, L-Leucin und L-Methionin enthielt. Die Fütterungsgeschwindigkeit begann mit 2,5 g/l^h Glucose und wurde innerhalb von 24 Stunden kontinuierlich auf 5,0 g/l^h gesteigert und anschließend bis zum Ende des Fermentationsprozesses konstant gehalten.

10 Die Fermentation wurde beendet, nachdem eine Gesamtmenge von 350 g/l Glucose zugegeben worden war. Zu diesem Zeitpunkt war eine typische optische Dichte von 250 bis 280 bei 546 nm erreicht.

Zur Inaktivierung der Biomasse wurde der Ansatz auf etwa 10°C gekühlt und gleichzeitig der pH-Wert mit H_2SO_4 auf 2,0 eingestellt. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation abgetrennt und bei -70°C gefroren aufbewahrt.

15

Beispiel 3: Extraktion

Säureinaktivierte Biomasse (etwa 0,5 kg) wurde in 500 ml 1%iger Essigsäure mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators suspendiert und 1 Stunde bei 0°C gerührt. Polyethylenimin (50%ige Stammlösung, Serva, Heidelberg) wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,25% (w/v) zugegeben. Die Suspension wurde mit 5 N NaOH auf einen pH von 10,0 eingestellt und weitere 2 Stunden bei 0°C gerührt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 mit 5 N HCl wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei $17000 \times g$ (Beckmann J2-21 Zentrifuge) abgetrennt. Die durchschnittliche Extraktionsausbeute betrug $29,3 \pm 5,9\%$ des Gesamtgehaltes an IFN α 2c.

25

Beispiel 4: Chromatographische Reinigung

Adsorptionschromatographie auf Silicagel

Der IFN α -haltige Überstand nach der Abtrennung des Bakterienpellets in Beispiel 3 wurde auf eine Silicagel-Säule geladen (Grace, Silica Typ 953W; 35 mg Protein/ml Säulenmaterial, Flußgeschwindigkeit 25 ml/mm), die mit 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, equilibriert worden war. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumina Startpuffer gewaschen, dann folgte ein Waschschriff mit 20 mM Tris-HCl, 100 mM Tetramethylammoniumchlorid (TMAC), pH 7,5. IFN α 2c konnte durch Steigerung der TMAC-Konzentration auf 800 mM TMAC eluiert werden (Fig. 3A).

35

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das Material, das von der Silicagelsäule eluiert wurde, wurde durch Zugabe von festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 20% (w/u) eingestellt und auf eine Phenylsepharosesäule (Phenyl Toyopearl, 650S, Tosohaas) geladen, die mit 20 mM Tris-HCl, 30% Ammoniumsulfat equilibriert worden war. IFN α 2c wurde mit einem linearen Gradienten von 100% Ladebedingungen bis 100% 20mM Tris-HCl, 30% Ethylenglykol, pH 7,5, bei einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/min eluiert. Die Reinheit des IFN α -Pools betrug $71 \pm 15\%$.

45

Kationenaustauschchromatographie

Das Eluat der hydrophoben Interaktionschromatographie wurde durch extensive Dialyse auf 20 mM Na-Succinat, pH 5,0, eingestellt. Der endgültige pH wurde mit HCl auf 3,0 eingestellt, bevor die Probe auf ein Sulfopropyl-Ionenaustauscherharz (Toyopearl TSK SP 5PW, Tosohaas), equilibriert mit 20 mM Na-Succinat, pH 5,0, geladen wurde. IFN α 2c wurde mit einem linearen Gradienten von 100% Ladebedingungen bis 100% 20 mM Na-Succinat, 500 mM NaCl, 10% Ethylenglykol, pH 5,5 (Lösungsmittel B) mit einer Flußgeschwindigkeit von 6 ml/min von der Säule eluiert. Das von dieser Säule eluierte IFN α 2c hatte routinemäßig eine größere Reinheit als 95%.

55

Anionenaustauschchromatographie

Der IFN α -Pool wurde gegen 10 mM bisTris, pH 5,8, dialysiert und auf eine DEAE-Sepharose (DEAE-Sepharose FastFlow, Pharmacia) geladen, die mit dem gleichen Puffer equilibriert war. Die Elution von IFN α 2c erfolgte mit einem linearen Gradienten auf 10 mM bisTris, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 5,8 (Lösungsmittel B), Flußgeschwindigkeit 5 ml/min.

60

Beispiel 5: Analyse der IFN α 2c-Präparationen

Reversed-Phase-HPLC

65 Intaktes IFN α 2c wurde mit einer BakerBond -WP- C18-Säule [250 x 4,5 mm, Partikelgröße 5 μm] bei 30°C analysiert. Für die Trennung von tryptischen Peptiden wurde eine Merck Supersphere 120-4 C18-Säule [125 x 4,5 mm, Partikelgröße 4 μm] bei 37°C verwendet. Die Proben wurden unter Verwendung der Lösungsmittel A, 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser, und B, 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril und mit den Gradienten

wie in der jeweiligen Abbildungslegende beschrieben chromatographiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

IFN α 2c-Proben wurden auf 16%-SDS-Polyacrylamid-Gelen unter Standardbedingungen analysiert. Proben wurden vor der Elektrophorese mit Dithiotreitol reduziert. Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blue-Färbung visualisiert.

Quantifizierung von IFN α 2c durch ELISA

Der IFN α 2c-Gehalt verschiedener Proben, die während der Reinigung anfielen, wurde mit einem Sandwich-ELISA mit den monoklonalen Antikörpern OMG-2 und MG-7 (Adolf et al, 1990) bestimmt.

Literatur

- Adolf, G.R., Virology 175, 410—417 (1990)
- Bodo, G. & Maurer-Fogy, I., in: The Biology of the Interferon System 1985 (Hrsg.: Stewart, W.E., II & Schellekens, H.), S. 59—64, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam (1985)
- Breitling R., Gerlach D., Hartmann M., Behnke D., Mol. Gen. Genet. 217, 384—391 (1989)
- Chang C.N., Kuang W.-J. and E.Y. Chen, Gene 44, 121—125 (1986)
- Dworkin-Rastl E., Swetly P., Dworkin M.B., Gene 21, 237—248 (1983)
- Fuh G., Mulkerrin M.G., Bass S., McFarland M., Brochier M., Bourell J.H., Light D.R., Wells J.A., J. Biol. Chem. 265, 3111—3115 (1990)
- Goeddel D.V., Yelverton E., Ullrich A., Heynecker H.L., Miozarri G., Holmes W., Seeburg P.H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J.M., Gross M., Familletti P.C., Pestka S., Nature 287, 411—416 (1980)
- Goeddel D.V., Leung D.W., Dull T.J., Gross M., Lawn R.M., McCandliss R., Seeburg P.H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P., Nature 290, 20—26 (1981)
- Hauptmann R. and P. Swetly, Nucl. Acids Res. 13, 4739—4749 (1985)
- Ho S.N., Hunt S.N., Horton R.M., Pullen J.K. and L.R. Pease, Gene 77, 51—59 (1989)
- Lee C.H., Mosely S.L., Moon H.W., Whipp S.C., Gyles C.L. and M. So, Infection and Immunity 42, 264—268 (1983)
- Mantei N., Schwarzstein M., Streuli M., Panem S., Nagata S., Weissmann C., Gene 10, 1—10 (1980)
- Picken R.N., Mazaitis A.J., Maas W.K., Rey M. and H. Heyneker, Infection and Immunity 42, 269—275 (1983)
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., "Molecular cloning — a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)
- Shuttleworth M., Taylor J. and N. Minton, Nucl. Acids Res. 14, 8689 (1986)
- Streuli M., Nagata S., Weissmann C., Science 209, 1343—1347 (1980)
- Thatcher D.R., Panayotatos N., Methods Enzymol. 119, 166—177 (1986)
- Twigg A.J. and D. Sherratt, Nature 283, 216—218 (1980).

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung von Interferon- α durch Expression in *E. coli*, dadurch gekennzeichnet, daß
 - Interferon- α exprimiert wird in Zellen, die einen Vektor enthalten, in dem die Signalsequenz des Gens für das hitzestabile Enterotoxin II (STII) aus *E. coli* verknüpft ist mit einer Sequenz, die für reifes menschliches Interferon- α kodiert
 - das exprimierte Interferon- α isoliert wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor zusätzlich einen Promotor für die alkalische Phosphatase (*phoA*) aus *E. coli* enthält.
- Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor zusätzlich die Sequenz für die Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens enthält.
- Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung des Interferons die Schritte
 - Adsorptionschromatographie auf Silicagel
 - Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
 - Kationenaustauschchromatographie
 - Anionenaustauschchromatographie
 enthält.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Phenylsepharose-Säule durchgeführt wird.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationenaustauschchromatographie auf einem Sulfopropyl-Ionenaustauscher durchgeführt wird.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sepharose durchgeführt wird.
- Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- α 2 ist.
- Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α 2 die Aminosäuresequenz

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
 Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser
 Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
 His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 10 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys
 Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 15 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp
 Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 20 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

enthält.

25 10. Verfahren zur Reinigung von Interferon- α , dadurch gekennzeichnet, daß es die Schritte

- a) Adsorptionschromatographie auf Silicagel
- b) Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
- c) Kationenaustauschchromatographie
- d) Anionenaustauschchromatographie

enthält.

30 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Phenylsepharose-Säule durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationenaustauschchromatographie auf einem Sulfopropyl-Ionenaustauscher durchgeführt wird.

35 13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sephadex durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Ansprüchen 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α bakteriell exprimiert wurde.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- $\alpha 2$ ist.

40 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- $\alpha 2$ die Aminosäuresequenz

45 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
 Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser
 Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
 50 His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys
 55 Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp
 60 Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

enthält.

65 17. Vektor zur Expression von Interferon- α in E. coli, dadurch gekennzeichnet, daß er die Signalsequenz des STII-Gens in Verknüpfung mit einer Sequenz enthält, die für reifes menschliches Interferon- α kodiert.

18. Vektor nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich einen phoA-Promotor enthält.

19. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich die Ribosomenbin-

dungsstelle des STII-Gens enthält.

20. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- $\alpha 2$ ist.

21. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er die Nukleotidsequenz

```

TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC      5
TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC
TGC TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG
TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC      10
CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG
GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC
TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT      15
GTG ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG
GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC
ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG      20
GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA
ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA

```

25

oder eine Sequenz, die zu dieser Sequenz zu mehr als 70% homolog ist und für Interferon- α kodiert, enthält.

22. Vektor nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß er die Nukleotidsequenz

```

GAATTCGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAG      30
CGGTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCCGATGCCAGCATT
CCTGACGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCT
CGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCTATAAAGTTGTACGGCCGAGACT      35
TATAGTCGCTTTGTTTTATTTTTTAATGTATTTGCTCGAGAGGTTGAGGTGATTTT
ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT
TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT CTG CCT CAA      40
ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA
CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG AAG GAC AGA
CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC      45
CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG
CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT
TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC      50
CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG
GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG
GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA      55
GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA
GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA      60
AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGATAACGATCGTAACTGCA

```

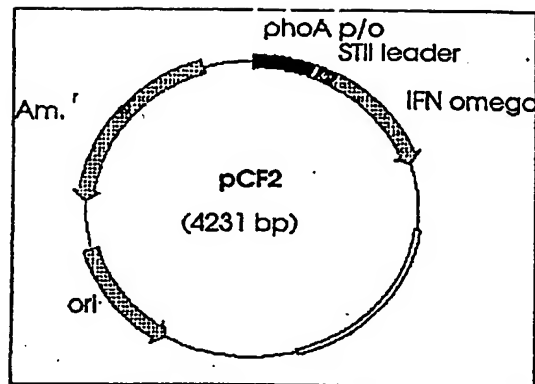
65

enthält.

23. Verwendung des Vektors gemäß einem der Ansprüche 17 bis 22 zur Herstellung von Interferon- α .

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

A)



B)

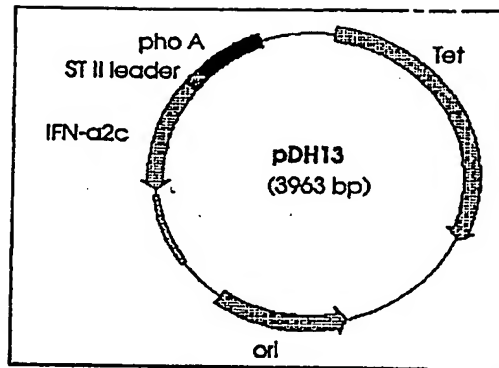
```

gaattggagattatcgctcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac 55
agcgggttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag 110
cattcctgacgacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag 165
catcctcgtcagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg 220
ccgagacttatagtcgctttgtttttatttttaaatgtatttgctcgagaggttg 275
aggtgatttt ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT 318
                M K K N I A F L L A S 11
ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT 360
M F V F S I A T N A Y A C D 25
CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC TTG GTG 402
L P Q N H G L L S R N T L V 39
CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT CTC 444
L L H Q M R R I S P F L C L 53
AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA 486
K D R R D F R F P Q E M V K 67
GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT 528
G S Q L Q K A H V M S V L H 81
GAG ATG CTG CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC 570
E M L Q Q I F S L F H T E R 95
TCC TCT GCT GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC 612
S S A A W N M T L L D Q L H 109
ACT GGA CTT CAT CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG 654
T G L H Q Q L Q H L E T C L 123
CTG CAG GTA GTG GGA GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC 696
L Q V V G E G E S A G A I S 137
AGC CCT GCA CTG ACC TTG AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT 738
S P A L T L R R Y F Q G I R 151
GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA 780
V Y L K E K K Y S D C A W E 165
GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA 822
V V R M E I M K S L F L S T 179
AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA GAT AGA GAC CTG GGC 864
N M Q E R L R S K D R D L G 193
TCA TCT TGA aatgattctcattgattaatttgccatataacacttgcacatg 916
S S * 196
tgactctgggtcaattcaaaagactcttatttcggctttaatcacagaattgactg 971
aattagttctgcaataactttgtcggtatattaagccagtatatgtttaaaaagac 1026
ttaggttcaggggcatcagtccttaagatgttattttatttttactcatttattta 1081
ttcttacattttatcatatttataactatttataatttcttatataacaaatgtttgc 1136
ctttacattgtattaagataacaaaacatgttccaggatcc 1176

```

Fig. 1

A)



B)

EcoRI

```

gaattcgagattatcgtcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac 55
agcggttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag 110
cattcctgacgacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag 165
catcctcgtcagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg 220

```

XhoI

```

ccgagacttatagtcgctttgtttttattttttaatgtatttgctcagaggttg 275

```

STIII Leader peptide ->

```

aggtgatttt ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT 318
             M  K  K  N  I  A  F  L  L  A  S  11

```

IFNα2c ->

```

ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT 360
M  F  V  F  S  I  A  T  N  A  Y  A  C  D  25
CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG 402
L  P  Q  T  H  S  L  G  S  R  R  T  L  M  39
CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG 444
L  L  A  Q  M  R  R  I  S  L  F  S  C  L  53
AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC 486
K  D  R  R  D  F  G  F  P  Q  E  E  F  G  67
AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG 528
N  Q  F  Q  K  A  E  T  I  P  V  L  H  E  81
ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA 570
M  I  Q  Q  I  F  N  L  F  S  T  K  D  S  95
TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT 612
S  A  A  W  D  E  T  L  L  D  K  F  Y  T  109
GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA 654
E  L  Y  Q  Q  L  N  D  L  E  A  C  V  I  123
CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC 696
Q  G  V  G  V  T  E  T  P  L  M  K  E  D  137
TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC 738
S  I  L  A  V  R  K  Y  F  Q  R  I  T  L  151
TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT 780
Y  L  K  E  K  K  Y  S  P  C  A  W  E  V  165
GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC 822
V  R  A  E  I  M  R  S  F  S  L  S  T  N  179

```

PvuI

PstI

```

TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA tgataacgatcgtaactgc 868
L  Q  E  S  L  R  S  K  E  188

```

HindIII

agaagctt

876

Fig. 2

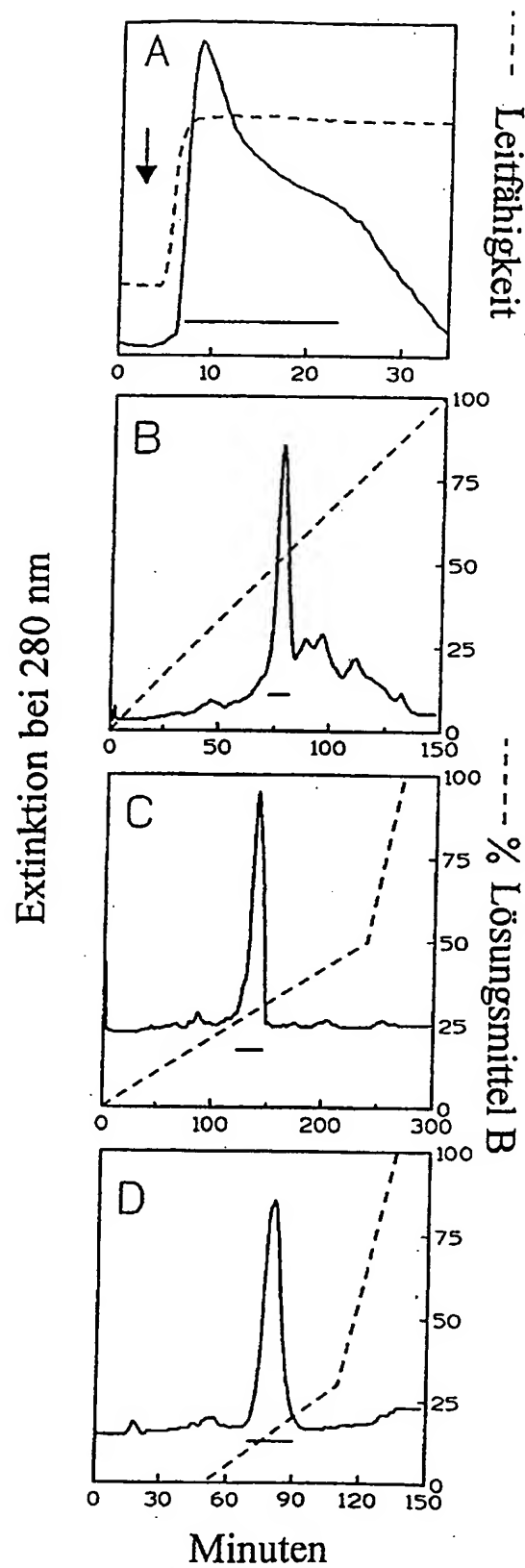


Fig. 3

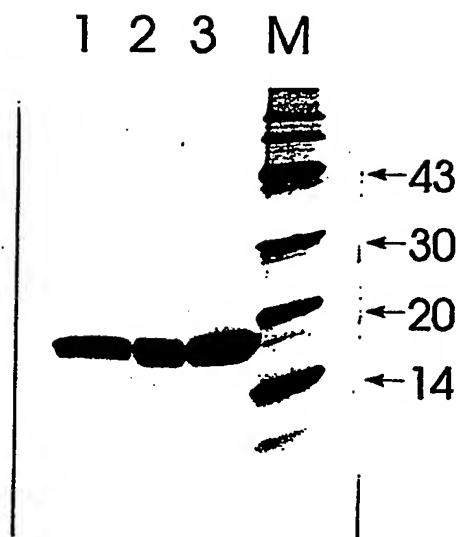


Fig. 4

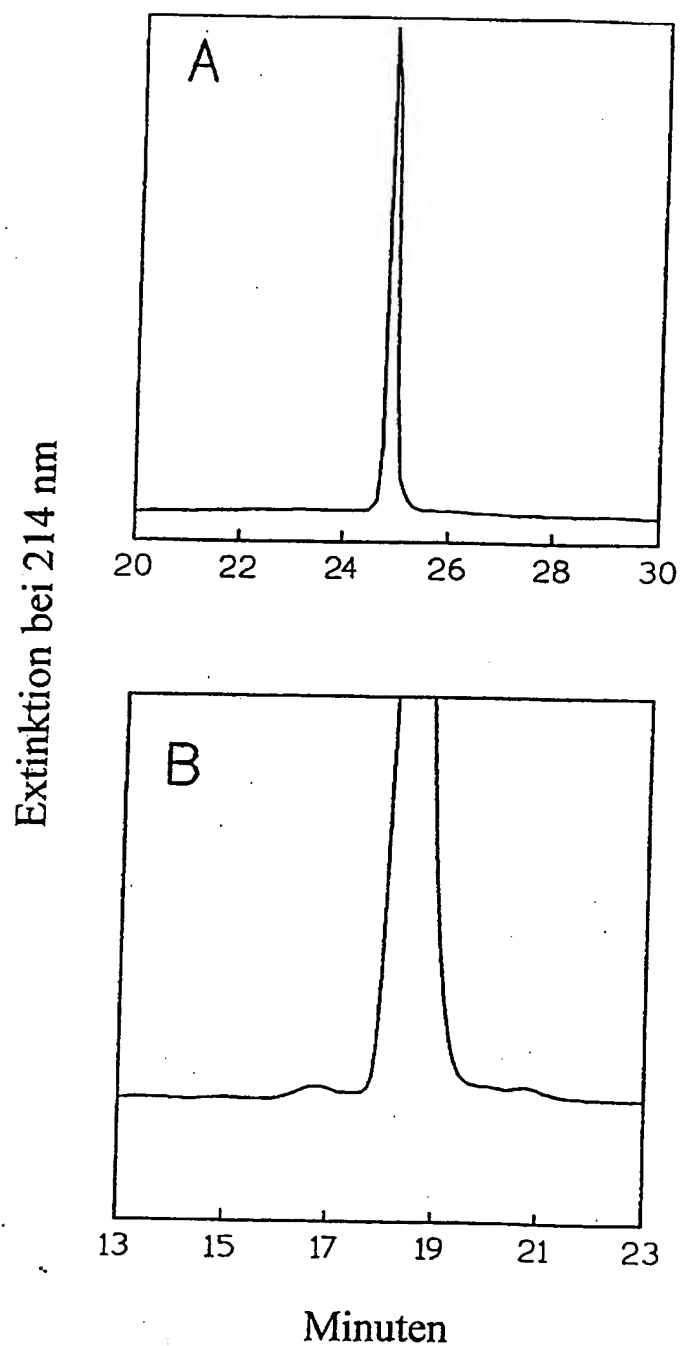


Fig. 5